

Please Click here to view the drawing

 Korean FullDoc

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11) Publication number: 1020030039872 A  
(43) Date of publication of application: 22.05.2003

(21) Application number: 1020010071242

(71) Applicant: GLUCAN, INC.

(22) Date of filing: 16.11.2001

(72) Inventor: JANG, SANG MOK

LEE, JIN U

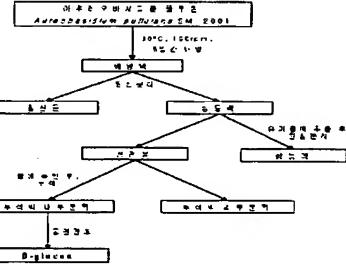
(51) Int. Cl

C12N 1/14

(54) MUTANT AUREOBASIDIUM SP. CAPABLE OF PRODUCING BETA-GLUCAN AND METHOD FOR PRODUCING BETA-GLUCAN USING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: A mutant *Aureobasidium* sp. capable of producing beta-glucan and a method for producing beta-glucan using the same are provided, thereby cheaply and rapidly producing high purity of beta-glucan. CONSTITUTION: A mutant *Aureobasidium* sp., *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (KCCM 10307), is capable of producing beta-glucan. A method for producing beta-glucan comprises the steps of: inoculating *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (KCCM 10307) to a medium containing a carbon source, a nitrogen source and inorganic salts, culturing it at 35 deg. C and 150 to 200 rpm for 55 to 85 hours; inoculating 3 to 5% (v/v) of the cultured medium to the same medium and culturing it at 25 to 35 deg. C and 150 to 200 rpm for 3 to 7 days; centrifuging the cultured medium at 5000 to 9000×g for 10 to 30 minutes to obtain the supernatant, adding an organic solvent into the supernatant, and centrifuging the supernatant to obtain a precipitate; and dissolving the precipitate in distilled water, followed by dialysis of the suspension to obtain a dialyzed inner fraction, and freeze-drying under vacuum.



copyright KIPO 2003

## Legal Status

Date of request for an examination (20011116)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20040709)

BEST AVAILABLE COPY



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(51) . Int. Cl. 7  
 C12N 1/14

(11) 공개번호      특2003-0039872  
 (43) 공개일자      2003년05월22일

(21) 출원번호      10-2001-0071242  
 (22) 출원일자      2001년11월16일

(71) 출원인      주식회사 글루칸  
 부산광역시 사하구 하단동 840 동아대학교 생물화학공학실험실

(72) 발명자      장상목  
 부산광역시 남구 대연동 1725-21, 청면그린빌라 A-201

이진우  
 부산 사하구 다대1동 1552번지 대우아파트 103동 503호

(74) 대리인      이덕록

심사청구 : 있음

**(54) 베타 글루칸을 생산하는 아우레오바시디움 속 변이주 및 이를 이용한 베타 글루칸의 생산방법**

**요약**

본 발명은 베타 글루칸을 생산하는 아우레오바시디움 속 변이주 및 이를 이용한 베타-글루칸의 생산방법에 관한 것이다. 생물고분자 풀루란을 생산하는 미생물 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*)에 돌연변이 유발원을 처리하여 선별한 본 발명 베타-글루칸 생산변이 균주 및 이를 이용한 베타-글루칸 제조방법은 기존의 약용버섯을 재배하여  $\beta$ -glucan을 추출하는 방법과 비교해서 함량을 월등히 높일 수 있으며, 복잡한 추출 및 정제 과정을 거치지 않고도 고순도의  $\beta$ -glucan을 얻을 수 있는 효과가 있고, 또한 제조시간과 비용의 절감 및 균일한 품질로 대량생산이 가능하다.

**대표도**

**도 1**

**색인어**

$\beta$ -glucan, 기능성 고분자 중합체, *Aureobasidium pullulans*, 항암효과

**명세서**

**도면의 간단한 설명**

도 1은 베타-글루칸( $\beta$ -glucan)의 바람직한 제조방법을 도식적으로 나타낸 공정도이다.

도 2는 본 발명 균주인 *Aureobasidium pullulans* SM 2001와 *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023의 형태적 특성을 비교한 사진이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 반영이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 베타 글루칸을 생산하는 아우레오바시디움 속 변이주 및 이를 이용한 베타-글루칸의 생산방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 생물고분자 풀루란을 생산하는 미생물 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*)에 돌연변이 유발원을 처리하여 선별한 베타-글루칸 생산변이 균주 및 이를 이용한 베타-글루칸 제조 방법에 관한 것이다.

대부분의 미생물들은 전분 또는 포도당과 같은 탄소원과 효모 추출액, 염화암모늄, 폐당밀 등의 질소원을 포함하는 영양원과 적당한 환경에서 생육을 시작하며, 그 중에는 우리 생활에 필요한 고분자 중합체를 생산하는 미생물들도 있다. 미생물이 생산하는 고분자 중합체로는 풀루란(pullulan), 젤란(gellan), 잔탄(xanthan), 커드란(curdalan) 등의 고질화제, 유화제, 안정제 및 젤이 이에 속하며, 전기 고분자 중합체들은 식품산업 및 화공산업에 널리 사용되고 있다. 이와 같은 기능성 고분자 중합체는 국내에서 생산되지 않고, 전량을 외국에서 수입하고 있는데, 1997년의 수입액은 약 800억원 정도이었으며, 식품첨가물로서 식품의 질을 향상시키기 위하여 필수 불가결한 물질이므로 수입량은 계속 증가할 것이다.

특히, 면역기능과 항암효능이 널리 알려져 있는 고분자 중합체  $\beta$ -glucan은 아가리쿠스 버섯과 상황버섯에 다양 함유가 되어 있는데, 원료물질을 해외에서 수입하거나 버섯을 인공 재배하여 원료로 하여 추출 및 분리, 정제를 통해 제품을 생산하는 실정이며, 제품화되기까지 60일 정도의 장기간이 소요되고 상당히 고가이기 때문에 상품화와 다양한 응용제품 개발에 걸림돌이 되고 있다. 따라서,  $\beta$ -glucan을 생산하는 기술을 획기적으로 개발하여 생산단가를 보다 더 낮추거나, 원활한 원료공급을 확보해야 할 것이나, 이에 대한 국내의 관심과 기술은 전무한 실정이다. 따라서, 국내 뿐만 아니라, 전세계적으로 면역활성화 물질로 주목을 받는 기능성 고분자 중합체인  $\beta$ -glucan을 미생물에 의해 대량으로 생산한다면, 이는 수입대체 효과뿐만 아니라 고부가가치를 창출하고 또한 국민의 건강증진 측면에서도 매우 중요한 의미를 지닌다고 할 것이다.

종래, 베타-글루칸을 생산하는 미생물로는 미국특허문현 5,504,079에 1-3 결합 베타 글루칸을 생산하는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) R4 계통에 대하여 공지되어 있으며, 미국특허문현 5,508,191에는 1-3 결합 베타 글루칸을 생산하는 아그로박테리움(*A. grobacterium*)의 변이주에 대하여 공지된 바 있다. 그러나 아우레오바시디움 속 변이주 및 이를 이용한  $\beta$ -글루칸의 대량생산방법에 대하여는 연구된 바 없다.

#### 반영이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은  $\alpha$ -1,4 및  $\alpha$ -1,6 결합의  $\alpha$ -glucan인 풀루란을 생산하는 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*)에 UV 처리로 돌연변이를 유도한 다음 베타-글루칸( $\beta$ -glucan)을 생산하는 변이주를 획득하였으며, 핵자기공명기를 사용하여 생산된  $\beta$ -glucan을 확인하였다.  $\beta$ -glucan을 생산하는 이 변이주를 *Aureobasidium pullulans* SM 2001로 명명하고 이 균주를 적당한 탄소원과 질소원, 무기염류를 첨가한 배지에서 배양한 후, 상기 배양액으로부터 경제적인 양의  $\beta$ -glucan을 분리·정제하는 방법을 개발하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은  $\beta$ -glucan을 생산하는 이 변이주를 제공함에 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 이용한  $\beta$ -글루칸의 대량생산방법을 제공함에 있다.

### 발명의 구성 및 사용

본 발명에서는 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*)에 UV 처리로 돌연변이를 유도한 다음 베타-글루칸( $\beta$ -glucan)을 생산하는 변이주를 선별하고, 이 균주를 아우레오바시디움 풀루란스 SM-2001(*Aureobasidium pullulans* SM-2001)로 명명하였다.

본 발명  $\beta$ -글루칸을 생산하는 변이주인 아우레오바시디움 풀루란스 SM-2001는 균학적 특성 및 분류학적 특성은 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans* ATCC 42023)와 동일하나, 도 2에 나타난 바와 같이 콜로니(colony)의 형태가 풀루란을 생산하는 균주의 콜로니에 비하여 크기가 크고 콜로니 표면에 윤기가 적으며 다소 얇은

콜로니의 색깔이 띠는 것을 그 특징으로 한다.

또한 본 발명 균주에서 생산되는  $\beta$ -glucan은  $\beta$ -1,3 및  $\beta$ -1,6 결합이 서로 혼재되어 있는 branched  $\beta$ -glucan으로서 결정화도가 낮은 무정형 구조를 지닌 수용성의 포도당 homopolymer임을 특징으로 한다.

본 발명은  $\beta$ -glucan을 생산하는 미생물을 탄소원과 질소원, 무기염류를 포함하는 배지에 접종하여, 25 내지 35°C에서 150 내지 200rpm으로 55 내지 85시간 동안 배양한 중균 배양액을 전기 배지에 3 내지 5%(v/v)로 접종하고, 25 내지 35°C에서 150 내지 200rpm으로 3 내지 7일 동안 배양하여 배양액을 수득하는 공정; 상기 공정의 배양액을 5000 내지 9000×g의 범위에서 10 내지 30분 동안 원심분리하여 얻은 상등액에 유기용매를 가하여 추출하고, 상기 추출액을 원심분리하여 침전물을 수득하는 공정; 및 상기 침전물을 중류수에 용해시킨 후, 투석하여 투석 내부분획을 수득하고, 상기 투석 내부분획을 진공 동결 건조하여 고분자 중합체  $\beta$ -글루칸을 생산하는 공정으로 구성된다.

상기 공정에 있어서, 유기용매는 이소프로판을 또는 에탄올을 사용하며, 투석은 배제 분자량이 12,000 내지 14,000인 것을 사용한다.

$\beta$ -glucan을 생산하는 배지는 5g/L의  $K_2HPO_4$ , 1g/L의 NaCl, 0.2g/L의  $MgSO_4$ , 0.6g/L의  $(NH_4)_2SO_4$  (Sigma Co., U.S.A) 및 2.5g/L의 효모 추출물 (yeast extract, Difco Lab., U.S.A.)이 포함된 것을 사용하며, 탄소원으로 포도당을 멸균한 후, 멸균된 배지에 무균적으로 0.5~2%(v/v)으로 혼합하여 사용한다.

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 상세히 설명한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니다.

#### 실시예 1 : U.V 처리에 의한 돌연변이 유발, $\beta$ -glucan을 생산하는 미생물의 선별 및 이를 이용한 $\beta$ -glucan의 생산

##### 제1공정 : $\beta$ -glucan을 생산하는 미생물의 선별

$\alpha$ -1,4 및  $\alpha$ -1,6 결합의  $\alpha$ -glucan인 풀루란을 생산하는 아우레오바시디움 풀루란스 (*Aureobasidium pullulans* A TCC 42023)를 자외선 (U.V.) 조사에 의해 돌연변이 시키고 선별한 변이주를 배양하였다. 배양액 중에 생산된 고분자 중합체를 핵자기 공명분석기로 구조 분석하여  $\beta$ -glucan을 생산하는 균주를 선별하였다.

먼저, 자외선을 조사하여  $\beta$ -glucan을 생산하는 변이주를 얻는 방법은 하기와 같다. 일정 시간 배양한 풀루란 생산균의 배양액을 7000rpm의 범위에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 균체 회수하였다. 회수한 균체에 멸균한 생리식염수 (0.85% NaCl) 용액을 첨가하여 적당히 회석한 후, 무균적인 상태를 유지하면서 일정한 세기의 자외선을 시간별로 조사하였다. 조사한 자외선의 양은 30W/cm<sup>2</sup>이며 자외선과 균주 혼탁액과의 직선거리는 60 cm이었다. 자외선을 조사한 시간은 30초, 1분, 2분, 3분 및 5분이었으며 자외선을 조사하지 않은 대조구와 비교하여 사멸률을 결정하였다. 시간별로 자외선을 조사한 균체를 회석하여 고체 배양배지에 도말한 후, 30°C의 항온기에서 3일간 배양하였다. 배양하여 형성된 균체의 콜로니의 색깔, 모양 및 크기 등으로 변이주를 선별하였다. 선별된 변이주 배양하고 배양액에서 고분자물질을 분리하여 화학구조를 분석하고 생산성을 측정하였다.  $\beta$ -글루칸을 생산하는 변이주의 콜로니는 풀루란을 생산하는 균주의 콜로니에 비하여 콜로니의 크기가 크고 콜로니 표면에 윤기가 적었으며 다소 얇은 콜로니의 색깔이 띠고 있었다.

선별한 균주를 아우레오바시디움 풀루란스 (*Aureobasidium pullulans*) SM-2001로 명명함과 동시에, 2001년 8월 8일자로 한국종균협회 부설 한국 미생물보존센터에 기탁하여, 기탁번호 KCCM 10307를 부여받았다.

##### 제2공정 : 배양액의 수득

$\beta$ -glucan을 생산하는 배지는 5g/L의  $K_2HPO_4$ , 1g/L의 NaCl, 0.2g/L의  $MgSO_4$ , 0.6g/L의  $(NH_4)_2SO_4$  (Sigma Co., U.S.A) 및 2.5g/L의 효모 추출물 (yeast extract, Difco Lab., U.S.A.)이 포함된 것을 사용하였다. 탄소원으로 포도당을 멸균한 후, 멸균된 배지에 무균적으로 2%(v/v)으로 혼합하여 사용하였다. 전 배양은 고체 배지에서 일정시간 배양한 아우레오바시디움 풀루란스 (*Aureobasidium pullulans* SM-2001)를 한 백금니 취하여 250ml 용량의 플라스크에 멸균하여 준비된 50ml의 배지에 접종한 후, 30°C에서 180rpm의 진탕 속도로 72시간 진탕 배양하였다. 본 배양은 전배양한 배양액을 500ml 용량의 플라스크에 멸균되어 준비된 150ml의 동일 배지에 5% (v/v)를 접종하여 전배양과 동일한 방법으로 5일간 배양하였다.

##### 제3공정 : $\beta$ -glucan의 분리 및 정제

상기 배양액을  $8000\times g$ 의 범위에서 20분간 원심분리하고 균체를 제거한 상동액을 회수하였다. 전기 회수한 상동액에 2배 용량의 95% 에탄올을 첨가하고, 잘 혼합하여 4°C에서 하루밤 동안 방치하였다. 이 용액을  $8000\times g$ 의 범위에서 20분간 원심분리하고 상동액을 제거한 후, 침전물을 95% 에탄올로 2회 세척하였다. 세척한 침전물을 적당한 양의 중류수에 용해시킨 다음, 2일 동안에 5회 중류수를 바꿔어 주면서 투석하여 염성분을 포함한 저분자 물질을 제거하였다. 투석 막은 배제 분자량이 13,000 kDa인 것을 사용하였으며, 상기 투석 내부 분획을 진공 동결 건조하여 회수하였다. 최종적으로 핵자기 공명분석법외에 화학적으로 정량분석을 실시하여  $\beta$ -glucan임을 확인하고, 농도를 확인하였다.

#### 실시예 2 : 핵자기 공명분석기(NMR)를 통한 $\beta$ -glucan의 정성분석

표준시료인 Curdlan(Sigma Co.  $\beta$ -1,3 결합), Pustulan(Calbiochem Co.,  $\beta$ -1,6 결합), Yeast glucan(Sigma Co.  $\beta$ -1,3 및 1,6 결합)을 각기 5mg씩 0.5㎖의  $Me_2SO_4-d_6$ 에 녹여 70°C에서 하루동안 두어 용해시켰으며,  $\beta$ -glucan을 에탄올에 넣어 하루간 4°C에서 방치한 후 원심분리를 통해 가라앉은 글루칸 결정을 건조시켜 5mg 취하여 위와 동일한 방법으로 용해시켜 NMR 시료를 조제하였다. NMR 분석은 70°C에서 500MHz Varian Unity Plus Spectrometer(Varian Co.)을 통해 분석하였고, Trimethylsilane(TMS)를 표준물질로 사용하였다. NMR 분석결과  $\beta$ -glucan 배양액은 표준시료로 쓰인 yeast glucan과 동일한 화학결합 구조를 지니고 있는 것으로 확인되었고,  $\beta$ -1,3 및  $\beta$ -1,6 결합이 서로 혼재되어 있는 branched  $\beta$ -glucan으로서 결정화도가 낮은 무정형 구조를 지닌 수용성의 포도당 homopolymer인  $\beta$ -glucan인 것으로 판단되었다.

#### 실시예 3 : $\beta$ -glucan의 화학적 정량분석

시료의 글루칸 함량을 화학적 정량법에 의해 측정하였다. 사용된 분석방법은 총당량 분석법(Phenol-sulfuric acid method), 환원당 분석법(DNS method), 과당 분석법(sulfuric acid-cystein-HCl-tryptophan method)이며, 시료의 단당류, 이당류 및 수용성 올리고당의 성분 및 정량분석을 위하여 고압액체 크로마토그래피(HPLC, Model-305, Gilson Co.)로 분석하였으며, 분석 칼럼은 Cosmosil 5NH<sub>2</sub> packed column(Nacalai Co.), 용출용매는 acetonitrile과 초순수 65:35 (v/v) 혼합용액, 용출속도는 1.0mL/min이었으며, RI detector를 통해 분석하였다.

화학분석 결과 총당량은 833 mg/100ml, 환원당량은 236 mg/100ml이었으며 이를 기초로 하여 계산한  $\beta$ -글루칸의 농도는 597 mg/100ml 이었다. 이는 배양액에서 분리한  $\beta$ -글루칸을 건조하여 얻은 건조중량과 유사한 수치이다. 고속액체 크로마토그래피를 사용한 분석결과 배양액에 존재하는 당류는 한가지 종류의 단당류와 몇가지 종류의 수용성 올리고당 및 다당류가 검출되었다.

#### 발명의 효과

상기 실시예를 통하여 명백한 바와 같이, 본 발명 베타-글루칸 생산법이 균주 및 이를 이용한 베타-글루칸 제조방법에 따르면, 종래의 약용버섯을 재배하여  $\beta$ -glucan을 추출하는 방법과 비교해서 함량을 월등히 높일 수 있으며, 복잡한 추출 및 정제 과정을 거치지 않고도 고순도의  $\beta$ -glucan을 얻을 수 있는 효과가 있고, 또한 제조시간과 비용의 절감 및 균일한 품질로 대량생산가능하며,  $\beta$ -glucan 이외의 이노시톨, 식품섬유, 올리고당 등의 생리활성물질들이 혼재된 상태에서 배양액을 가열 멸균하는 공정은 단일의  $\beta$ -glucan 보다 효과가 높고, 공정단축이라는 장점도 함께 지니고 있으므로 식품산업상 매우 유용한 발명인 것이다..

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

베타-글루칸( $\beta$ -glucan)을 생산하는 아우레오바시디움 속 균주(*Aureobasidium* sp.).

##### 청구항 2.

제1항에 있어서, 기탁번호가 KCCM 10307인 아오레오바시디움 풀루란스 SM-2001.

##### 청구항 3.

제1항 또는 제2항의 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 베타-글루칸( $\beta$ -glucan)의 제조방법.

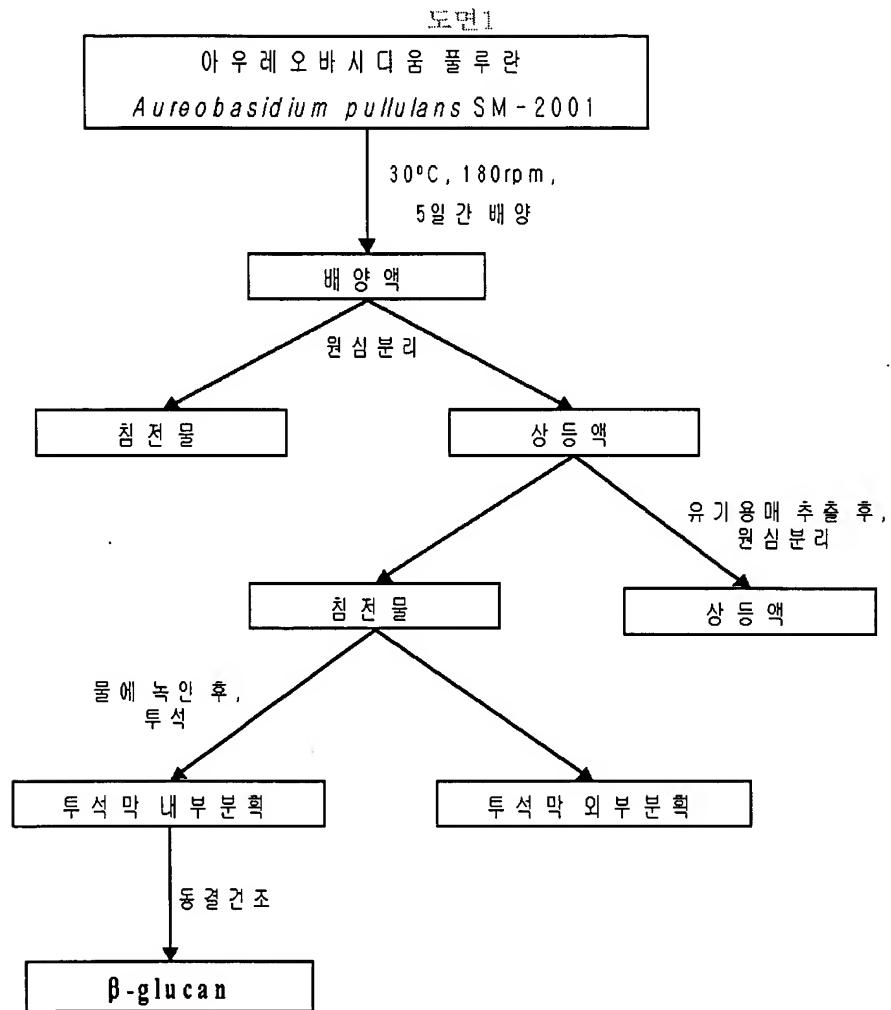
##### 청구항 4.

제3항에 있어서, (a)  $\beta$ -glucan을 생산하는 미생물을 탄소원과 질소원, 무기염류를 포함하는 배지에 접종하여, 25 내지 35°C에서 150 내지 200rpm으로 55 내지 85시간 동안 배양한 종균 배양액을 전기 배지에 3 내지 5%(v/v)로 접종하고, 25 내지 35°C에서 150 내지 200rpm으로 3 내지 7일 동안 배양하여 배양액을 수득하는 공정;

(b) 상기 (a) 단계의 배양액을 5000 내지 9000×g의 범위에서 10 내지 30분 동안 원심분리하여 얻은 상등액에 유기 용매를 가하여 추출하고, 상기 추출액을 원심분리하여 침전물을 수득하는 공정; 및,

(c) 상기 (b) 단계의 침전물을 증류수에 용해시킨 후, 투석하여 투석 내부분획을 수득하고, 상기 투석 내부분획을 진공 동결 건조하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 고분자 중합체  $\beta$ -glucan의 제조방법.

노면



도면2

